

1/19/1

012125794

WPI Acc No: 1998-542706/199846

XRAM Acc No: C98-163144

New adenovirus with mutations in the fibre protein to alter binding selectivity - related nucleic acid and cell lines expressing, or mutant viruses containing, the fibre, particularly useful as selective vectors for gene therapy

Patent Assignee: CENT NAT RECH SCI (CNRS); TRANSGENE SA (TRGE); CNRS
CENT NAT RECH SCI (CNRS)

Inventor: BOULANGER P; LEGRAND V; MEHTALI M

Number of Countries: 024 Number of Patents: 007

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9844121	A1	19981008	WO 98FR668	A	19980402	199846 B
FR 2761688	A1	19981009	FR 973987	A	19970402	199846
FR 2761689	A1	19981009	FR 974747	A	19970417	199846
AU 9870547	A	19981022	AU 9870547	A	19980402	199910
EP 991763	A1	20000412	EP 98917294	A	19980402	200023
			WO 98FR668	A	19980402	
JP 2001522236	W	20011113	JP 98541260	A	19980402	200204
			WO 98FR668	A	19980402	
AU 741728	B	20011206	AU 9870547	A	19980402	200206

Priority Applications (No Type Date): FR 974747 A 19970417; FR 973987 A 19970402

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
WO 9844121	A1	F	65	C12N-015/34	

Designated States (National): AU CA JP SG US

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE

FR 2761688 A1 C07K-014/075

FR 2761689 A1 C07K-014/075

AU 9870547 A C12N-015/34 Based on patent WO 9844121

EP 991763 A1 F C12N-015/34 Based on patent WO 9844121

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

JP 2001522236 W 65 C12N-015/09 Based on patent WO 9844121

AU 741728 B C12N-015/34 Previous Publ. patent AU 9870547
Based on patent WO 9844121

Abstract (Basic): WO 9844121 A

New adenovirus (Ad) fibre (A) has at least one mutation in residues that are involved in binding to the natural cellular receptor of AD, present between the CD loop and beta -sheet I of the fibre, particularly between the CD and DG loops. Also new are: (1) Ad fibre (A') having significantly reduced ability to bind the natural cellular receptor and able to trimerise; (2) DNA fragments (II) or expression vector's encoding (A) or (A'); (3) cell lines having (II) integrated into the genome, or in episomal form, under control of expression elements; (4) Ad lacking a functional native fibre but including (A) or (A'), encoded by the viral genome or provided in trans by the cells of (3), and optionally also a ligand (III) that recognises a cell surface molecule other than the natural receptor; and (5) host cells infected with Ad of (4).

USE - Ad of (4), or cells of (3), are used for gene therapy in humans or animals, i.e. to express, from an inserted gene, a

therapeutic protein, antisense RNA or ribozymes, for treating tumours, infections, genetic diseases (e.g. haemophilia, cystic fibrosis, muscular dystrophy etc.) or cardiovascular disease (e.g. restenosis).

ADVANTAGE - Ad containing the new fibres and (III) have altered cell specificity, so can be precisely targeted to selected cells, particularly tumour or infected cells, or those with a particular cell surface marker. This allows a reduction in the dose of virus required and avoids problems associated with expression of cytotoxic genes in healthy cells.

Dwg.0/5

Title Terms: NEW; ADENOVIRUS; FIBRE; PROTEIN; ALTER; BIND; SELECT; RELATED; NUCLEIC; ACID; CELL; LINE; EXPRESS; MUTANT; VIRUS; CONTAIN; FIBRE; USEFUL; SELECT; VECTOR; GENE; THERAPEUTIC

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C07K-014/075; C12N-015/09; C12N-015/34

International Patent Class (Additional): A61K-035/76; A61K-038/00; A61K-038/27; A61K-038/28; A61K-038/43; A61K-038/55; A61K-039/395; A61K-048/00; C12N-005/10; C12N-007/00; C12N-007/01; C12N-015/86

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-C01; B04-E08; B04-F01; B04-F0100E; B04-F1100E; B04-G01; B04-N04; B10-A07; B14-F02D; B14-H01; B14-J05; B14-K01; B14-S03; D05-H12D2; D05-H12D4; D05-H12E; D05-H12F; D05-H14; D05-H17A6

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M710 M903 P517 P522 P633 P815 P820 Q233 V500 V560
02 M423 M710 M903 N135 P517 P522 P633 P815 P820 Q233 V754
03 M423 M710 M903 N135 Q233 V754
04 M423 M710 M903 N135 Q233 V753

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2002 Thomson Derwent. All rights reserved.

© 2002 The Dialog Corporation

[▶ Logoff Information]**Estimated Costs for Command Search session:**

08aug02 16:56:34 User104956 Session C758.4
Sub account: 1406-37
\$8.88 0.343 DialUnits File351
\$9.84 2 Type(s) in Format 9
\$9.84 2 Types
\$18.72 Estimated cost File351
\$0.65 INTERNET
\$19.37 Estimated cost this search
\$20.38 Estimated total session cost 0.662 DialUnits

You are now logged off from DialogWeb

continue >>

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

11 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 761 688

21 N° d'enregistrement national : 97 03987

51 Int Cl⁶ : C 07 K 14/075, C 12 N 15/34, 5/10, 7/01, 15/86,
A 61 K 48/00

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 02.04.97.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 09.10.98 Bulletin 98/41.

56 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

71 Demandeur(s) : TRANSGENE SA SOCIETE ANO-
NYME — FR et CENTRE NATIONAL DE LA RECHER-
CHE SCIENTIFIQUE CNRS — FR.

72 Inventeur(s) : LEGRAND VALERIE, MEHTALI MAJID
et BOULANGER PIERRE.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire(s) : REGIMBEAU.

54 FIBRE ADENOVIRALE MODIFIEE ET ADENOVIRUS CIBLES.

57 La présente invention a pour objet une fibre d'un adé-
novirus modifiée par mutation d'un ou plusieurs résidus, les-
dits résidus étant dirigés vers le récepteur cellulaire naturel
dudit adénovirus au niveau de la structure tridimensionnelle.
Elle concerne également un fragment d'ADN, un vecteur
d'expression ainsi qu'une lignée cellulaire exprimant ladite
fibre. Enfin, elle a trait à un adénovirus la comprenant, le
procédé pour produire un tel adénovirus et une cellule hôte
infectable ainsi qu'à leur usage thérapeutique et une com-
position pharmaceutique correspondante

FR 2 761 688 - A1



La présente invention a pour objet une fibre adénovirale mutée dans les régions impliquées dans la reconnaissance et la liaison du récepteur cellulaire naturel des adénovirus. Elle concerne également les adénovirus recombinants portant à leur surface une telle fibre et un ligand qui leur confère une spécificité d'hôte modifiée ou
5 ciblée envers un type cellulaire particulier, les cellules contenant ces adénovirus ainsi qu'une méthode pour préparer des particules virales infectieuses de ces derniers destinées à un usage thérapeutique. L'invention présente un intérêt tout particulier pour des perspectives de thérapie génique, notamment chez l'homme.

Grâce à leurs propriétés particulières, les adénovirus sont employés dans un
10 nombre croissant d'applications en thérapie génique. Mis en évidence dans de nombreuses espèces animales, ils sont peu pathogènes, non-intégratifs et se répliquent aussi bien dans les cellules en division que quiescentes. De plus, ils présentent un large spectre d'hôte et sont capables d'infecter un très grand nombre de types cellulaires tels que les cellules épithéliales, endothéliales, les myocytes, les
15 hépatocytes, les cellules nerveuses et les synoviocytes (Bramson et al., 1995, Curr. Op. Biotech. 6, 590-595). Cependant, cette absence de spécificité d'infection pourrait constituer une limite à l'utilisation des adénovirus recombinants, d'une part, au niveau de la sécurité puisqu'il peut y avoir dissémination du gène recombinant dans l'organisme hôte et, d'autre part, au niveau de l'efficacité puisque le virus n'infecte pas
20 spécifiquement le type cellulaire que l'on souhaite traiter.

D'une manière générale, le génome adénoviral est constitué d'une molécule d'ADN linéaire, bicaténaire et d'environ 36kb contenant les gènes codant pour les protéines virales et à ses extrémités deux répétitions inversées (désignées ITR pour Inverted Terminal Repeat) intervenant dans la réplication et la région d'encapsidation.
25 Les gènes précoces sont répartis en 4 régions dispersées dans le génome adénoviral (E1 à E4 ; E pour early en anglais), comportant 6 unités transcriptionnelles munies de leurs propres promoteurs. Les gènes tardifs (L1 à L5 ; L pour late en anglais) recouvrent en partie les unités de transcription précoces et sont, pour la plupart, transcrits à partir du promoteur majeur tardif MLP (pour Major Late Promoter en
30 anglais).

A titre indicatif, tous les adénovirus utilisés dans les protocoles de thérapie génique sont déficients pour la réplication par délétion d'au moins la région E1 et sont propagés dans une lignée cellulaire de complémentation, qui fournit *en trans* les fonctions virales délétées. On utilise couramment la lignée 293, établie à partir de
5 cellules de rein embryonnaire humain, qui complémente efficacement la fonction E1 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72). Des vecteurs de seconde génération ont récemment été proposés dans la littérature. Ils conservent les régions *en cis* nécessaires à la réplication du virus dans la cellule infectée (ITRs et séquences d'encapsidation) et comportent des délétions internes importantes visant à supprimer
10 l'essentiel des gènes viraux dont l'expression *in vivo* peut conduire à l'établissement de réponses inflammatoires ou immunitaires chez l'hôte. Les vecteurs adénoviraux et leur technique de préparation ont fait l'objet de nombreuses publications accessibles à l'homme du métier.

Le cycle infectieux des adénovirus se déroule en 2 étapes. La phase précoce
15 précède l'initiation de la réplication et permet de produire les protéines précoces régulant la réplication et la transcription de l'ADN viral. La réplication du génome est suivie de la phase tardive au cours de laquelle sont synthétisées les protéines structurales qui constituent les particules virales. L'assemblage des nouveaux virions prend place dans le noyau. Dans un premier temps, les protéines virales s'assemblent
20 de manière à former des capsides vides de structure icosaédrique dans lesquelles le génome est encapsidé. Les adénovirus libérés sont susceptibles d'infecter d'autres cellules permissives. A cet égard, la fibre et le penton base présents à la surface des capsides jouent un rôle critique dans l'attachement cellulaire des virions et leur internalisation.

25 L'adénovirus se lie à un récepteur cellulaire présent à la surface des cellules permissives par l'intermédiaire de la fibre trimérique (Philipson et al., 1968, J. Virol. 2, 1064-1075 ; Defer et al., 1990, J. Virol. 64, 3661-3673). La particule est ensuite internalisée par endocytose par la liaison du penton base aux intégrines cellulaires $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ (Mathias et al., 1994, J. Virol. 68, 6811-6814). La capacité de la fibre
30 soluble ou d'anticorps anti-fibre à inhiber l'infection démontre son rôle dans l'attachement cellulaire du virus.

La fibre est composée de 3 domaines (Chroboczek et al., 1995, *Current Top. Microbiol. Immunol.* 199, 165-200) :

- (1) En N-terminal, la queue très conservée d'un sérotype à l'autre, interagit avec le penton base et assure l'ancrage de la molécule dans la capside.
- 5 (2) La tige est une structure en bâtonnet composée d'un certain nombre de répétitions de feuillet β , ce nombre variant selon les sérotypes.
- (3) Enfin, à l'extrémité distale de la tige, la tête est une structure globulaire sphérique qui contient les signaux de trimérisation (Hong et Engler, 1996, *J. Virol.* 70, 7071-7078 ; Novelli et Boulanger, 1991, *J. Biol. Chem.* 266, 9299-10 9303 ; Novelli et Boulanger, 1991, *Virology* 185, 365-376). De plus, la plupart des données expérimentales montrent que le domaine de la tête est responsable de la liaison aux cellules permissives (Henry et al., 1994, *J. Virol.* 68, 5239-5246 ; Louis et al., 1994, *J. Virol.* 68, 4104-4106).

Des adénovirus "ciblés" dont la fibre native est modifiée de manière à
15 reconnaître un récepteur cellulaire différent ont déjà été proposés dans la littérature. Ainsi, WO94/10323 décrit des mutants de la fibre d'Ad5 dans lesquels une séquence codant pour un fragment d'anticorps (de type scFv) est insérée à la fin de l'une des 22 unités répétitives de la tige dans le but de modifier la spécificité d'infection à l'égard des cellules présentant l'antigène cible. US 5,543,328 décrit une fibre chimère Ad5
20 dans laquelle le domaine de la tête est remplacé par le facteur de nécrose des tumeurs (TNF) de manière à interagir avec le récepteur cellulaire du TNF. Dans une autre construction, la fibre native d'Ad5 est fusionnée à son extrémité C-terminale au peptide ApoE permettant une liaison au récepteur LDL (pour low density lipoprotein en anglais) présent à la surface des cellules hépatiques. WO95/26412 décrit une fibre
25 modifiée par incorporation d'un ligand à l'extrémité C-terminale qui conserve ses capacités de trimérisation. WO96/26281 décrit une fibre chimère obtenue par remplacement d'une partie de la fibre native et, en particulier de la tête, par la partie équivalente d'une fibre adénovirale d'un autre sérotype et, éventuellement, par insertion à l'extrémité C-terminale d'un peptide RGD spécifique de la vitronectine.

Comme précédemment indiqué, la spécificité d'infection d'un adénovirus est déterminée par l'attachement de la fibre adénovirale à un récepteur cellulaire situé à la surface des cellules permissives. La demande de brevet français 97 01005 a mis en évidence le rôle des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et des modules III de la fibronectine à titre respectivement de récepteur primaire et de co-facteur des adénovirus. Mais d'autres protéines peuvent intervenir. Le problème que la présente invention se propose de résoudre est de modifier la région d'interaction de la fibre adénovirale avec le récepteur cellulaire afin d'altérer la spécificité d'hôte naturelle des adénovirus portant la fibre mutée. L'addition d'un ligand permet de conférer un nouveau tropisme envers un ou plusieurs types cellulaires spécifiques portant à leur surface une molécule cible reconnue par le ligand en question.

La présente invention constitue une amélioration de la technique antérieure puisqu'elle divulgue la région de la fibre à muter pour inhiber ou empêcher la liaison au récepteur cellulaire naturel des adénovirus. On a maintenant substitué ou délété un ou plusieurs résidus de la région 443 à 462 de la tête de la fibre d'Ad5 et montré une inhibition de l'infectivité des adénovirus correspondants à l'égard des cellules normalement permissives. L'introduction du ligand GRP (pour gastrin releasing peptide en anglais) au sein de cette fibre permet l'infection des cellules exprimant le récepteur au GRP. Le but de la présente invention est de diminuer les quantités thérapeutiques d'adénovirus à utiliser et de cibler l'infection au niveau des cellules à traiter. Cette spécificité est indispensable lorsque l'on met en oeuvre un adénovirus exprimant un gène cytotoxique pour éviter la propagation de l'effet cytotoxique aux cellules saines. Les avantages procurés par la présente invention sont de réduire les risques de dissémination et les effets secondaires liés à la technologie adénovirale.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet une fibre d'un adénovirus modifiée par mutation d'un ou plusieurs résidus de ladite fibre, caractérisée en ce que lesdits résidus mutés sont dirigées vers le récepteur cellulaire naturel dudit adénovirus.

Le terme "fibre" est largement défini dans la partie introductive. La fibre de la présente invention peut dériver d'un adénovirus d'origine humaine, canine,

aviaire, bovine, murine, ovine, porcine ou simienne ou encore être hybride et comprendre des fragments d'origines diverses. Concernant les adénovirus humains, on préfère utiliser ceux de sérotype C et, notamment, les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad2 ou Ad5). On indique que la fibre d'Ad2 comporte 580 acides aminés (aa) dont la séquence est divulguée dans Herissé et al. (1981, Nucleic Acid Res. 9, 4023-4042). Celle d'Ad5 présente 582 aa et sa séquence présentée à l'identificateur de séquence 1 (SEQ ID NO: 1) a été déterminée par Chroboczek et Jacrot (1987, Virology 161, 549-554). Lorsque la fibre de la présente invention est originaire d'un adénovirus animal, on a de préférence recours aux adénovirus bovins et, en particulier, ceux de la souche BAV-3. Ces derniers ont fait l'objet de nombreuses études et la séquence de la fibre est divulguée dans la demande internationale WO95/16048. Bien entendu, la fibre de la présente invention peut présenter d'autres modifications par rapport à la séquence native, outre celles qui font l'objet de la présente invention.

Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, la fibre selon l'invention est modifiée de manière à réduire ou abolir sa capacité de liaison au récepteur cellulaire naturel. Une telle propriété peut être vérifiée par l'étude de l'infectivité ou de la liaison cellulaire des virus correspondants en appliquant les techniques de l'art telles que celles détaillées ci-après. Selon un mode de réalisation avantageux, Les propriétés de trimérisation et de liaison au penton-base ne sont pas affectées.

Au sens de la présente invention, le terme "mutation" désigne une délétion, une substitution ou encore une addition d'un ou plusieurs résidus ou une combinaison de ces possibilités. On préfère tout particulièrement le cas où les régions d'interaction avec le récepteur cellulaire naturel sont délétées en totalité ou en partie et remplacées notamment par un ligand spécifique d'une protéine de surface cellulaire autre que le récepteur naturel des adénovirus.

La structure cristallographique tridimensionnelle de la tête adénovirale a été déterminée par Xia et al. (1994, Structure 2, 1259-1270). Chaque monomère comporte 8 feuillets β antiparallèles désignés A à D et G à J et 6 boucles majeures de 8 à 55 résidus. Par exemple, la boucle CD relie le feuillet β C au feuillet β D.

On indique que les feuillets mineurs E et F sont considérés comme faisant partie de la boucle DG située entre les feuillets D et G. A titre indicatif, le tableau 1 indique la localisation de ces structures dans la séquence en acides aminés de la fibre d'Ad5 telle que montrée à l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO: 1), le +1
 5 représentant le résidu Met initiateur. D'une manière générale, les feuillets forment une structure ordonnée et compacte alors que les boucles sont plus flexibles. Ces termes sont classiques dans le domaine de la biochimie des protéines et sont définis dans les ouvrages de base (voir par exemple Stryer, Biochemistry, 2ième édition, Chap 2, p 11 à 39, Ed Freeman et Compagny, San Francisco).

10

Tableau 1

feuille β		boucle	
nomenclature	résidus	nomenclature	résidus
A	400 à 403	AB	404 à 418
B	419 à 428	-	-
C	431 à 440	CD	441 à 453
D	454 à 461	DG	462 à 514
G	515 à 521	GH	522 à 528
H	529 à 536	HI	537 à 549
I	550 à 557	IJ	558 à 572
J	573 à 578		

15 Les quatre feuillets β A, B, C et J constituent les feuillets V dirigés vers la particule virale. Les quatre autres (D, G, H et I) forment les feuillets R, supposés faire face au récepteur cellulaire. Les feuillets V semblent jouer un rôle important dans la trimérisation de la structure alors que les feuillets R seraient impliqués dans l'interaction avec le récepteur. Les résidus de la fibre d'Ad2, Ad3, Ad5, Ad7, Ad40,
 20 Ad41 et de l'adénovirus canin CAV formant ces différentes structures sont clairement indiqués dans la référence précédente.

Les modifications de la fibre adénovirale selon l'invention touchent plus particulièrement le domaine s'étendant de la boucle CD au feuillet I et concernent notamment les résidus 441 à 557 de la fibre Ad5 et 441 à 558 de la fibre d'Ad2. Du fait de leur localisation spatiale dans la fibre native, ces résidus sont susceptibles de reconnaître et/ou interagir directement au indirectement avec le récepteur cellulaire naturel de l'adénovirus concerné. Au sein de cette région, on préfère modifier la partie qui comprend la boucle CD, le feuillet D et la partie proximale de la boucle DG (positions 441 à 478 de la fibre d'Ad2 et d'Ad5) et, plus particulièrement, la région s'étendant des résidus 443 à 462 pour ce qui est de l'Ad5 ou 451 à 466 dans le cas de l'Ad2.

Comme indiqué précédemment, on peut opérer par substitution d'un ou plusieurs acides aminés dans les régions exposées. On peut citer à ce titre les exemples suivants qui dérivent de la fibre d'Ad5 dans laquelle :

- le résidu glycine en position 443 est substitué par un acide aspartique,
- 15 - le résidu leucine en position 445 est substitué par une phénylalanine,
- le résidu glycine en position 450 est substitué par une asparagine,
- le résidu thréonine en position 451 est substitué par une lysine,
- le résidu valine en position 452 est substitué par une asparagine,
- le résidu alanine en position 455 est substitué par une phénylalanine,
- 20 - le résidu leucine en position 457 est substitué par une alanine, et/ou
- le résidu isoleucine en position 459 est substitué par une alanine.

Il est également possible d'introduire plusieurs substitutions au sein de la région ciblée de la fibre notamment au niveau des acides aminés formant un coude, de préférence de type $\alpha\alpha$ (voir le Tableau 2 de Xia et al., 1994, *supra*). Pour illustrer, on peut citer les deux exemples suivants dans lesquels la fibre d'Ad5 est modifiée par substitution :

- du résidu glycine en position 443 par un acide aspartique,
- du résidu sérine en position 444 par une lysine, et
- du résidu alanine en position 446 par une thréonine.
- 30 ou encore
- du résidu sérine en position 449 par un acide aspartique,

- du résidu glycine en position 450 par une lysine,
- du résidu thréonine en position 451 par une leucine, et
- du résidu valine en position 452 par une thréonine.

5 Bien entendu, les acides aminés de remplacement ne sont mentionnés qu'à titre indicatif et tout acide aminé peut convenir aux fins de la présente invention. On préfère cependant ne pas modifier de façon drastique la structure tridimensionnelle. De préférence, les acides aminés formant un coude seront remplacés par des résidus formant une structure similaire tels que ceux cités dans la référence Xia et al. déjà
10 mentionnée.

La fibre de la présente invention peut également être modifiée par délétion. La région éliminée peut concerner en tout ou en partie du domaine exposé et, notamment de la boucle CD, du feuillet D et/ou de la boucle DG. Concernant une fibre d'Ad5 selon l'invention, on peut citer plus particulièrement la délétion :

- 15 - de la région s'étendant de la sérine en position 454 à la phénylalanine en position 461,
- de la région s'étendant de la valine en position 441 à la glutamine en position 453, ou
- de la région s'étendant de la valine en position 441 à la phénylalanine en
20 position 461.

Selon un mode de réalisation avantageux, lorsque l'une au moins des modifications est une délétion d'au moins 3 résidus consécutifs d'une boucle et/ou d'un feuillet, les résidus délétés peuvent être remplacés par des résidus d'une boucle et/ ou d'un feuillet équivalent dérivé d'une fibre d'un second adénovirus susceptible
25 d'interagir avec un récepteur cellulaire différent de celui reconnu par le premier adénovirus. Ceci permet de maintenir la structure de la fibre selon l'invention tout en lui conférant une spécificité d'hôte correspondant à celle du second adénovirus. Comme indiqué dans Xia et al. (1994, *supra*), le récepteur cellulaire médiant l'infection des adénovirus de types 2 et 5 est différent de celui interagissant avec les
30 adénovirus de types 3 et 7. Ainsi, une fibre d'Ad5 ou d'Ad2 délétée d'au moins 3 résidus consécutifs parmi ceux spécifiés ci-dessus peut-être substituée par les résidus issus d'une région équivalente de la fibre d'Ad3 ou d'Ad7 pour réduire sa capacité à

lier le récepteur d'Ad5 et lui conférer une nouvelle spécificité envers le récepteur cellulaire d'Ad3 ou d'Ad7. A titre d'exemple non limitatif, on peut citer le remplacement des résidus LAPISGTVQSAHLIRFD (positions 445 à 462) de la fibre d'Ad5 par les résidus VNTLFKNKNVSINVELYFD de la fibre d'Ad3.

5 La présente invention concerne également une fibre d'un adénovirus présentant une capacité de liaison au récepteur cellulaire naturel substantiellement réduite et néanmoins capable de trimériser.

 Selon un mode de réalisation également avantageux, la fibre selon l'invention comprend en outre un ligand. Au sens de la présente invention, le terme ligand définit
10 toute entité capable de reconnaître et lier, de préférence avec une forte affinité, une molécule de surface cellulaire différente du récepteur cellulaire naturel. Cette molécule peut être exprimée ou exposée à la surface de la cellule que l'on désire cibler (marqueur de surface cellulaire, récepteur, peptide antigénique présenté par les antigènes d'histocompatibilité...). Conformément aux buts poursuivis par la présente
15 invention, un ligand peut être un anticorps, un peptide, une hormone, un polypeptide ou encore un sucre. Le terme anticorps comprend notamment les anticorps monoclonaux, les fragments d'anticorps (Fab) et les anticorps simple chaîne (scFv). Ces dénominations et abréviations sont conventionnelles dans le domaine de l'immunologie.

20 Dans le cadre de la présente invention, il peut être intéressant de cibler plus particulièrement une cellule tumorale, une cellule infectée, un type cellulaire particulier ou une catégorie de cellules portant un marqueur de surface spécifique. Par exemple, si la cellule hôte à cibler est une cellule infectée par le virus HIV (Human Immunodeficiency Virus), le ligand peut être un fragment d'anticorps contre
25 la fusine, le récepteur CD4 ou contre une protéine virale exposée (glycoprotéine d'enveloppe) ou encore la partie de la protéine TAT du virus HIV s'étendant des résidus 37 à 72 ; (Fawell et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 664-668). S'agissant d'une cellule tumorale, le choix se portera sur un ligand reconnaissant un antigène spécifique de tumeur (par exemple la protéine MUC-1 dans le cas du cancer
30 du sein, certains épitopes des protéines E6 ou E7 du papilloma virus HPV) ou surexprimé (récepteur à l'IL-2 surexprimé dans certaines tumeurs lymphoïdes).

Si l'on désire cibler les lymphocytes T, on peut employer un ligand du récepteur de cellule T. Par ailleurs, la transferrine est un bon candidat pour un ciblage hépatique. D'une manière générale, les ligands qui peuvent être utilisés dans le contexte de l'invention sont largement décrits dans la littérature et peuvent être clonés par les techniques standards. Il est également possible de les synthétiser par voie chimique et les coupler à la fibre selon l'invention. A cet égard, le couplage de résidus galactosyl devrait conférer une spécificité hépatique en raison de l'interaction avec les récepteurs aux asialoglycoprotéines. Mais le mode de réalisation préféré consiste à insérer le ligand à l'extrémité C-terminale de la fibre selon l'invention ou en remplacement des résidus délétés lorsque l'une au moins des modifications est une délétion d'au moins 3 résidus consécutifs.

La présente invention a également trait à un fragment d'ADN codant pour une fibre selon l'invention ainsi qu'à un vecteur d'expression d'un tel fragment. Tout type de vecteur peut être employé à cet effet, qu'il soit d'origine plasmidique ou virale, intégratif ou non. De tels vecteurs sont disponibles commercialement ou décrits dans la littérature. De même, l'homme du métier est capable d'adapter les éléments de régulation nécessaires à l'expression du fragment d'ADN selon l'invention.

La présente invention concerne également un adénovirus dépourvu d'une fibre native fonctionnelle et qui comprend à sa surface une fibre selon l'invention et un ligand tel que défini ci-dessus. Celle-ci peut être exprimée par le génome adénoviral ou apportée *en trans* par une lignée cellulaire de complémentation, telle que celles définies ci-après. De préférence, la spécificité de liaison d'un tel adénovirus à son récepteur cellulaire naturel est réduite de manière significative ou mieux abolie, du fait de la fibre modifiée qu'il porte. La perte de la spécificité naturelle peut être évaluée par des études d'attachement cellulaire réalisées en présence de virus marqués (par exemple à la ^3H thymidine selon la technique de Roelvink et al., 1996, J. Virol. 70, 7614-7621) ou par des études d'infectivité de cellules permissives ou exprimant la molécule de surface ciblée par le ligand (voir les exemples qui suivent).

Le ligand peut être couplé de manière chimique à l'adénovirus selon l'invention. Mais, on préfère la variante selon laquelle les séquences codant pour le

ligand sont insérées au sein du génome adénoviral, en particulier, au sein des séquences codant pour la fibre modifiée selon l'invention, de préférence, en phase afin de préserver le cadre de lecture. L'insertion peut avoir lieu à un endroit quelconque. Néanmoins, le site d'insertion préféré est en amont du codon stop à l'extrémité C-terminale ou à la place des résidus délétés. Il est également envisageable d'introduire les séquences du ligand au sein d'autres séquences adénovirales, notamment celles codant pour une autre protéine de capsid, comme l'hexon ou le penton.

Avantageusement, un adénovirus selon l'invention est recombinant et défectif pour la réplication, c'est à dire incapable de réplication autonome dans une cellule hôte. La déficience est obtenue par mutation ou délétion d'un ou plusieurs gènes viraux essentiels et, notamment, de tout ou partie de la région E1. Des délétions au sein de la région E3 peuvent être envisagées pour accroître les capacités de clonage. Cependant, il peut être avantageux de conserver les séquences codant pour la protéine gp19k (Gooding et Wood, 1990, *Critical Reviews of Immunology* 10, 53-71) afin de moduler les réponses immunitaires de l'hôte. Bien entendu, le génome d'un adénovirus selon l'invention peut également comprendre des délétions ou mutations supplémentaires affectant d'autres régions, notamment les régions E2, E4 et/ou L1-L5 (voir par exemple la demande internationale WO94/28152 et Ensinger et al., 1972, *J. Virol.* 10, 328-339 décrivant la mutation thermosensible du gène DBP de E2).

Selon un mode de réalisation préféré, un adénovirus selon l'invention est recombinant et comprend un ou plusieurs gène(s) d'intérêt placé(s) sous le contrôle des éléments nécessaires à son (leur) expression dans une cellule hôte. Le gène en question peut être d'une origine quelconque, génomique, ADNc (ADN complémentaire) ou hybride (minigène dépourvu d'un ou plusieurs introns). Il peut être obtenu par les techniques conventionnelles de biologie moléculaire ou par synthèse chimique. Il peut coder pour un ARN anti-sens, un ribozyme ou un ARNm qui sera ensuite traduit en polypeptide d'intérêt. Celui-ci peut être cytoplasmique, membranaire ou être sécrété de la cellule hôte. Par ailleurs, il peut s'agir de tout ou partie d'un polypeptide tel que trouvé dans la nature, d'un polypeptide chimère

provenant de la fusion de séquences d'origines diverses, ou d'un polypeptide muté par rapport à la séquence native présentant des propriétés biologiques améliorées et/ou modifiées.

Dans le cadre de la présente invention, il peut être avantageux d'utiliser les
5 gènes codant pour les polypeptides suivants :

- cytokines ou lymphokines (interférons α , β et γ , interleukines et notamment l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10 ou l'IL-12, facteurs nécrosant des tumeurs (TNF), facteurs stimulateurs de colonies (GM-CSF, C-CSF, M-CSF...) ;
- récepteurs cellulaires ou nucléaires, notamment ceux reconnus par des
10 organismes pathogènes (virus, bactéries, ou parasites) et, de préférence, par le virus VIH ou leurs ligands ;
- protéines impliquées dans une maladie génétique (facteur VII, facteur VIII, facteur IX, dystrophine ou minidystrophine, insuline, protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), hormones de croissance
15 (hGH) ;
- enzymes (uréase, rénine, thrombine....) ;
- inhibiteurs d'enzymes (α 1-antitrypsine, antithrombine III, inhibiteurs de protéases virales...) ;
- polypeptides à effet anti-tumoral capables d'inhiber au moins partiellement
20 l'initiation ou la progression de tumeurs ou cancers (anticorps, inhibiteurs agissant au niveau de la division cellulaire ou des signaux de transduction, produits d'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, par exemple p53 ou Rb, protéines stimulant le système immunitaire....) ;
- protéines du complexe majeur d'histocompatibilité des classes I ou II ou
25 protéines régulatrices agissant sur l'expression des gènes correspondants ;
- polypeptides capables d'inhiber une infection virale, bactérienne ou parasitaire ou son développement (polypeptides antigéniques ayant des propriétés immunogènes, épitopes antigéniques, anticorps, variants trans-dominants susceptibles d'inhiber l'action d'une protéine native par compétition...) ;

- toxines (thymidine kinase de virus simplex de l'herpès 1 (TK-HSV-1), ricine, toxine cholérique, diphtérique.....) ou immunotoxines ; et
- marqueurs (β -galactosidase, luciférase.....).

5 Il est à signaler que cette liste n'est pas limitative et que d'autres gènes peuvent également être employés.

Par ailleurs, un adénovirus selon l'invention peut, en outre, comprendre un gène de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules infectées. On peut citer les gènes *néo* (codant pour la néomycine phosphotransférase) conférant une
10 résistance à l'antibiotique G418, *dhfr* (Dihydrofolate Réductase), CAT (Chloramphenicol Acetyl transférase), *pac* (Puromycine Acétyl-Transférase) ou encore *gpt* (Xanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase). D'une manière générale, les gènes de sélection sont connus de l'homme de l'art.

Par éléments nécessaires à l'expression d'un gène d'intérêt dans une cellule
15 hôte, on entend l'ensemble des éléments permettant sa transcription en ARN et la traduction d'un ARNm en protéine. Parmi ceux-ci, le promoteur revêt une importance particulière. Dans le cadre de la présente invention, il peut dériver d'un gène quelconque d'origine eucaryote ou même virale et peut être constitutif ou régulable. Par ailleurs, il peut être modifié de manière à améliorer l'activité promotrice,
20 supprimer une région inhibitrice de la transcription, rendre un promoteur constitutif régulable ou vice versa, introduire un site de restriction..... Alternativement, il peut s'agir du promoteur naturel du gène à exprimer. On peut mentionner, à titre d'exemples, les promoteurs viraux CMV (Cytomegalovirus), RSV (Rous Sarcoma Virus), du gène TK du virus HSV-1, précoce du virus SV40 (Simian Virus 40),
25 adénoviral MLP ou encore les promoteurs eucaryotes des gènes PGK (Phospho Glycerate kinase) murin ou humain, α 1-antitrypsine (foie-spécifique), immunoglobulines (lymphocyte-spécifique).

Bien entendu, un gène d'intérêt en usage dans la présente invention peut en outre comprendre des éléments additionnels nécessaires à l'expression (séquence
30 intronique, séquence signal, séquence de localisation nucléaire, séquence terminatrice de la transcription, site d'initiation de la traduction de type IRES ou

autre....) ou encore à sa maintenance dans la cellule hôte. De tels éléments sont connus de l'homme de l'art.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'un adénovirus selon l'invention, selon lequel :

- 5 - on transfecte le génome dudit adénovirus dans une lignée cellulaire appropriée,
- on cultive ladite lignée cellulaire transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production dudit adénovirus, et
- on récupère ledit adénovirus dans la culture de ladite lignée cellulaire
- 10 transfectée et, éventuellement, on purifie substantiellement ledit adénovirus.

Le choix de la lignée cellulaire dépend des fonctions déficientes de l'adénovirus selon l'invention et on utilisera une lignée de complémentation capable de fournir *en trans* la ou les fonction(s) défectueuse(s). La lignée 293 convient pour compléter la fonction E1 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72). Pour

15 une double déficience E1 et E2 ou E4, on peut employer une lignée parmi celles décrites dans la demande de brevet français 96 04413. On peut également mettre en oeuvre un virus auxiliaire pour compléter l'adénovirus défectif selon l'invention dans une cellule hôte quelconque ou encore un système mixte utilisant cellule de complémentation et virus auxiliaire dans lequel les éléments sont dépendants les uns

20 des autres. Les moyens de propagation d'un adénovirus défectif sont connus de l'homme de l'art qui peut se référer par exemple à Graham et Prevec, 1991, Methods in Molecular Biology, vol 7, p 190-128 ; Ed E.J. Murey, The Human Press Inc.). Le génome adénoviral est de préférence reconstitué *in vitro* dans *Escherichia coli* (*E. coli*) par ligation ou encore recombinaison homologue (voir par exemple la demande

25 française 94 14470). Les procédés de purification sont décrits dans l'état de la technique. On peut citer la technique de centrifugation sur gradient de densité.

La présente invention concerne également une lignée cellulaire comprenant soit sous forme intégrée dans le génome ou sous forme d'épisome un fragment d'ADN codant pour une fibre selon l'invention placé sous le contrôle des éléments permettant

30 son expression. Ladite lignée peut dériver d'une cellule de complémentation d'une ou plusieurs fonctions adénovirales sélectionnées parmi celles codées par les régions E1,

E2, E4 et L1-L5. Elle dérive de préférence de la lignée 293. Une telle lignée peut être utile à la préparation d'un adénovirus dont le génome est dépourvu de tout ou partie des séquences codant pour la fibre (de manière à produire une fibre non fonctionnelle). La présente invention a également pour objet le procédé correspondant, selon lequel :

- on transfecte le génome dudit adénovirus dans une lignée cellulaire selon l'invention,
- on cultive ladite lignée cellulaire transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production dudit adénovirus, et
- 10 - on récupère ledit adénovirus dans la culture de ladite lignée cellulaire transfectée et, éventuellement, on purifie substantiellement ledit adénovirus.

La présente invention couvre également une cellule hôte infectable par un adénovirus selon l'invention ou susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'invention. Il s'agit avantageusement d'une cellule de mammifère et, notamment,
15 d'une cellule humaine. Elle peut être primaire ou tumorale et d'une origine quelconque, par exemple hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte ou macrophage ...), musculaire, nasale, pulmonaire, trachéale, hépatique, épithéliale ou fibroblaste.

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique
20 comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique, une cellule hôte ou un adénovirus selon l'invention ou susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'invention, en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. La composition selon l'invention est, en particulier, destinée au traitement préventif ou curatif de maladies telles que les maladies génétiques
25 (hémophilie, mucoviscidose, diabète ou myopathie de Duchenne, de Becker...), les cancers, comme ceux induits par des oncogènes ou des virus, les maladies virales, comme l'hépatite B ou C et le SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise résultant de l'infection par le VIH), et les maladies virales récurrentes, comme les infections virales provoquées par le virus de l'herpès.

30 Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier, on associe une quantité thérapeutiquement

efficace de l'agent thérapeutique ou prophylactique à un support tel qu'un diluant. Une composition selon l'invention peut être administrée par voie locale, systémique ou par aérosol, en particulier par voie intragastrique, sous-cutanée, intracardiaque, intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale, intratumorale, intrapulmonaire, intranasale ou intratrachéale. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage appropriés varient en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu ou de la maladie à traiter ou encore du ou des gène(s) d'intérêt à transférer. En particulier, les particules virales selon l'invention peuvent être formulées sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} ufp (unités formant des plages), avantageusement 10^5 et 10^{13} ufp et, de préférence, 10^6 et 10^{12} ufp. La formulation peut également inclure un adjuvant ou un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

Enfin, la présente invention est relative à l'usage thérapeutique ou prophylactique d'un adénovirus ou d'une cellule hôte selon l'invention ou d'un adénovirus susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique. Selon une première possibilité, le médicament peut être administré directement *in vivo* (par exemple par injection intraveineuse, dans une tumeur accessible, dans les poumons par aérosol...). On peut également adopter l'approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moëlle osseuse, lymphocytes du sang périphérique, cellules musculaires...), de les transfecter ou infecter *in vitro* selon les techniques de l'art et de les réadministrer au patient.

L'invention s'étend également à une méthode de traitement selon laquelle on administre une quantité thérapeutiquement efficace d'un adénovirus ou d'une cellule hôte selon l'invention à un patient ayant besoin d'un tel traitement.

EXEMPLES

Les exemples suivants n'illustrent qu'un mode de réalisation de la présente invention.

Les constructions décrites ci-dessous sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans Maniatis et al., (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. Les étapes de clonage mettant en oeuvre des plasmides bactériens sont réalisées de préférence dans la souche *E. coli* 5K (Hubacek et Glover, 1970, J. Mol. Biol. 50, 111-127) ou BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580). On utilise préférentiellement cette dernière souche pour les étapes de recombinaison homologue. La souche NM522 (Stratagène) convient à la propagation des vecteurs phagiques M13. Les techniques d'amplification par PCR sont connues de l'homme de l'art (voir par exemple PCR Protocols-A guide to methods and applications, 1990, édité par Innis, Gelfand, Sninsky et White, Academic Press Inc). S'agissant de la réparation des sites de restriction, la technique employée consiste en un remplissage des extrémités 5' protubérantes à l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Klenow). Les séquences nucléotidiques Ad5 sont celles utilisées dans la banque de donnée Genbank sous la référence M73260.

En ce qui concerne la biologie cellulaire, les cellules sont transfectées selon les techniques standards bien connues de l'homme du métier. On peut citer la technique au phosphate de calcium (Maniatis et al., *supra*), mais tout autre protocole peut également être employé, tel que la technique au DEAE dextran, l'électroporation, les méthodes basées sur les chocs osmotiques, la microinjection ou les méthodes basées sur l'emploi de lipides cationiques. Quant aux conditions de culture, elles sont classiques. Dans les exemples qui suivent, on a recours à la lignée humaine 293 (ATCC CRL1573) et aux lignées murines Swiss 3T3 (ATCC CCL92), NR6 (Wells et al., 1990, Science 247: 962-964) et NR6-hEGFR (Schneider et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 333-336). Il est entendu que d'autres lignées cellulaires peuvent également être utilisées.

EXEMPLE 1 : Construction d'un adénovirus présentant un tropisme d'hôte envers les cellules exprimant le récepteur du GRP (pour gastrin releasing peptide en anglais).

A. Insertion des séquences codant pour le ligand GRP (fibre-GRP).

Le plasmide pTG6593 dérive du p poly II (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201)
5 par introduction du gène complet codant pour la fibre d'Ad5 sous la forme d'un
fragment *EcoRI-SmaI* (nucléotides (nt) 30049 à 33093). Le fragment *HindIII-SmaI* (nt
31994-33093) est isolé et cloné dans M13TG130 (Kieny et al., 1983, Gene 26, 91-99)
digéré par ces mêmes enzymes, pour donner M13TG6526. Ce dernier est soumis à
une mutagenèse dirigée à l'aide de l'oligonucléotide oTG7000 (SEQ ID NO: 2) (kit
10 Sculptor, in vitro mutagenesis, Amersham) afin d'introduire un adaptateur codant pour
un bras espaceur de 12 acides aminés de séquence PSASASASAPGS. Le vecteur
muté ainsi obtenu, M13TG6527, est soumis à une seconde mutagenèse permettant
d'introduire la séquence codant pour les 10 résidus du peptide GRP
(GNHWAVGHLM ; Michael et al., 1995, Gene Ther. 2, 660-668). On utilise à cet
15 effet l'oligonucléotide oTG7001 (SEQ ID NO: 3). Le fragment *HindIII-SmaI* est isolé
du phage muté M13TG6528 et introduit par la technique de recombinaison
homologue (Chartier et al., 1996, J. Virol. 70, 4805-4810) dans le plasmide pTG6590
portant le fragment de génome adénoviral Ad5 s'étendant des nt 27081 à 35935 et
linéarisé par *MunI* (nt 32825). Le fragment *SpeI-ScaI* (portant les nt 27082 à 35935 du
20 génome Ad5 modifiés par introduction du bras espaceur et du peptide GRP) est isolé
du vecteur précédent désigné pTG8599 puis est échangé contre le fragment équivalent
de pTG6591 préalablement digéré par ces mêmes enzymes. A titre indicatif, pTG6591
comprend les séquences adénovirales sauvages des positions 21562 à 35935. On
obtient pTG4600 dont on isole le fragment *BstEII* (nt 24843 à 35233). Après
25 recombinaison homologue avec le plasmide pTG3602 qui comprend le génome Ad5
(décrit plus en détail dans la demande internationale WO96/17070), on génère le
vecteur pTG4601.

Une cassette permettant l'expression du gène LacZ est introduite à la place de la
région adénovirale E1 par recombinaison homologue entre le plasmide pTG4601

linéarisé par *Clal* et un fragment *BsrGI-PstI* comprenant le gène LacZ codant pour la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur MLP d'Ad2 et le signal de polyadénylation du virus SV40. Ce fragment est isolé du vecteur pTG8526 contenant l'extrémité 5' de l'ADN génomique viral (nt 1 à 6241) dans lequel la région E1 (nt 459
5 à 3328) est remplacée par la cassette d'expression LacZ. Sa construction est à la portée de l'homme du métier. Le vecteur final est désigné pTG4628.

Les virus correspondants AdTG4601 et AdTG4628 sont obtenus par transfection des fragments adénoviraux libérés des séquences plasmidiques par digestion *PacI* dans la lignée 293. A titre indicatif, AdTG4601 porte le génome Ad5 complet dans lequel le gène de la fibre comprend en son extrémité 3' un bras espaceur suivi du
10 peptide GRP. Le virus recombinant AdTG4628 porte en outre la cassette d'expression du gène rapporteur LacZ sous le contrôle du promoteur adénoviral MLP.

B. Etude du tropisme du virus portant la fibre-GRP.

15

La présence du peptide GRP au niveau de la fibre adénovirale permet de cibler les cellules exprimant à leur surface le récepteur au GRP. L'expression des messagers codant pour ce dernier est étudiée dans les cellules 293 et dans les cellules murines Swiss-3T3 (Zachary et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7616-7620) par
20 Northern-blot. On utilise à titre de sonde un mélange de 2 fragments d'ADN complémentaires à la séquence codant pour le récepteur au GRP marqués par les techniques conventionnelles à l'isotope ^{32}P . A titre indicatif, les fragments sont produits par PCR reverse à partir des ARN cellulaires totaux à l'aide des oligonucléotides oTG10776 (SEQ ID NO: 4) et oTG10781 (SEQ ID NO: 5) (Battey et
25 al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 395-399 ; Corjay et al., 1991, J. Biol. Chem. 266, 18771-18779). L'intensité des ARNm détectés est beaucoup plus importante dans le cas des cellules Swiss-3T3 que dans les cellules 293, indiquant la surexpression du récepteur GRP par la lignée murine.

Des expériences de compétition sont réalisées sur les 2 types de cellules. Le
30 compétiteur est constitué par la tête de la fibre d'Ad5 produite dans *E.coli* dont les

propriétés de liaison au récepteur cellulaire adénoviral ont été montrées (Henry et al., 1994, J. Virol 68, 5239-5246). Les cellules en monocouche sont préalablement incubées pendant 30 min en présence de PBS ou de concentrations croissantes de tête Ad5 recombinante (0,1 à 100 µg/ml) dans du milieu DMEM (Gibco BRL) complémenté avec du sérum de veau foetal 2% (FCS). Puis, le virus AdTG4628 dont la fibre contient le peptide GRP est ajouté à une multiplicité d'infection de 0,001 unité infectieuse/cellule pour 24h à 37°C. On utilise à titre de contrôle et selon les mêmes conditions expérimentales, le virus recombinant AdLacZ (Stratford-Perricaudet et al., 1992, J. Clin. Invest. 90, 626-630) qui porte un gène de la fibre natif. Les cellules sont ensuite fixées et l'expression du gène LacZ évaluée (Sanes et al., 1986, EMBO J. 5, 3133-3142). Le nombre de cellules bleues est représentatif de l'efficacité de l'infection virale. Une inhibition par compétition se traduit par une réduction du nombre de cellules colorées par rapport à un témoin non infecté (PBS).

L'addition de tête Ad5 recombinante à une concentration de 100 µg/ml inhibe fortement l'infection des cellules 293 par les virus AdLacZ et AdTG4628 (taux d'inhibition de 95 et 98%). Ceci suggère que la présence du compétiteur empêche l'interaction de la fibre adénovirale avec son récepteur cellulaire naturel. Par contre, les deux virus ont un comportement différent sur les cellules Swiss-3T3. L'infection du virus AdTG4628 en présence de 100 µg/ml de compétiteur n'est que partiellement inhibée alors que, dans les mêmes conditions expérimentales, celle du virus AdLacZ ayant la fibre native est totalement inhibée. Ces résultats suggèrent que l'infection des cellules Swiss-3T3 par l'AdTG4628 est en partie médiée par un récepteur indépendant, probablement le récepteur au GRP que ces cellules surexpriment. En conclusion, l'addition du ligand GRP à l'extrémité C-terminale de la fibre favorise l'infection des cellules exprimant le récepteur au GRP d'une manière indépendante de l'interaction fibre-récepteur cellulaire naturel.

EXEMPLE 2 : Construction d'un adénovirus présentant un tropisme d'hôte envers les cellules exprimant le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor en anglais).

Cet exemple décrit une fibre portant les séquences EGF à son extrémité C-terminale. Pour cela, on met en oeuvre les oligonucléotides oTG11065 (SEQ ID NO: 6) et oTG11066 (SEQ ID NO: 7) pour amplifier un fragment *HindIII-XbaI* à partir du plasmide M13TG6527. Les oligonucléotides oTG11067 (SEQ ID NO: 8) et
5 oTG11068 (SEQ ID NO: 9) permettent de générer un fragment *XhoI-SmaI* (allant du codon stop jusqu'au nt 33093) à partir de M13TG6527. L'ADN complémentaire de l'EGF, obtenu de l'ATCC (#59957), est amplifié sous forme d'un fragment *XhoI-XbaI* à l'aide des oligonucléotides oTG 11069 (SEQ ID NO: 10) et oTG11070 (SEQ ID NO: 11). Les 3 fragments digérés par les enzymes adéquates sont ensuite reliés
10 pour donner un fragment *HindIII-SmaI* contenant l'EGF fusionné à l'extrémité C-terminale de la fibre. On applique la même procédure de recombinaison homologue que celle décrite à l'exemple 1 pour replacer ce fragment dans son contexte génomique.

Cependant, on peut simplifier les étapes de clonage en introduisant un site
15 unique *BstBI* dans la région ciblée par les techniques classiques de mutagenèse. On obtient pTG4609. La recombinaison homologue entre pTG4609 linéarisé par *BstBI* et le fragment *HindIII-SmaI* précédant génère le plasmide pTG4225 portant la région E1 sauvage. Son équivalent portant la cassette d'expression LacZ pTG4226 est obtenu par recombinaison homologue avec le pTG4213 digéré par *BstBI*. Les virus
20 AdTG4225 et AdTG4226 peuvent être produits classiquement par transfection d'une lignée cellulaire appropriée par exemple surexprimant le récepteur de l'EGF.

Pour tester la spécificité d'infection de ces virus, on peut utiliser les cellules fibroblastiques murines NR6 et les cellules NR6-hEGFR exprimant le récepteur de l'EGF humain. Des compétitions avec la tête d'Ad5 recombinante ou avec l'EGF
25 permettent d'évaluer l'intervention des récepteurs cellulaires naturels et EGF pour médier l'infection des virus.

EXEMPLE 3 : **Modifications de la tête de la fibre pour éliminer la liaison au récepteur cellulaire naturel.**

La mutation de la région de la fibre adénovirale impliquée dans l'interaction avec le récepteur cellulaire naturel a été entreprise afin d'éliminer la capacité de la fibre à lier son récepteur naturel et l'addition d'un ligand permettra de modifier le tropisme des adénovirus correspondants.

- 5 Les séquences de la fibre Ad5 codant pour la région s'étendant des résidus 443 à 462 ont été soumises à diverses mutations. La délétion du feuillet D met en oeuvre l'oligonucléotide de mutagenèse oTG7414 (SEQ ID NO: 12) et la délétion de la boucle CD l'oligonucléotide oTGA (SEQ ID NO: 13). L'oligonucléotide oTGB (SEQ ID NO: 14) permet quant à lui la délétion de la boucle CD et du feuillet D.
- 10 Tous ces oligonucléotides contiennent un site *Bam*HI permettant de détecter facilement les mutants et, également, d'insérer les séquences codant pour un ligand, par exemple le peptide EGF.

- Une autre série de modifications consiste à remplacer ces régions délétées par les séquences équivalentes issues de la fibre d'Ad3. En effet, de nombreuses
- 15 données montrent que l'Ad5 et l'Ad3 ne se lient pas au même récepteur, de sorte qu'une telle substitution devrait abolir l'infection médiée par le récepteur Ad5 et cibler les cellules portant le récepteur Ad3. Le remplacement de la boucle CD Ad5 par celle de l'Ad3 met en oeuvre oTG11135 (SEQ ID NO: 15), le remplacement du feuillet D de la fibre Ad5 par celui de la fibre Ad3 est effectué par l'oligonucléotide
- 20 oTG10350 (SEQ ID NO: 16) et le remplacement du feuillet D et de la boucle CD de l'Ad5 par ceux de l'Ad3 est réalisé sur le mutant précédent à l'aide de oTG11136 (SEQ ID NO: 17).

On a également modifié cette région cible de la tête adénovirale par une série de mutations ponctuelles :

- 25 - remplacement du coude $\alpha\alpha$ GSLA en coude $\alpha\alpha$ DKLT: oTGC (SEQ ID NO: 18),
- remplacement du coude $\alpha\alpha$ SGTV en coude $\alpha\alpha$ DKLT : oTGD (SEQ ID NO: 19),
- G443 en D : oTGE (SEQ ID NO: 20),
- 30 - L445 en F : oTGF (SEQ ID NO: 21),

- 23 -

- G450 en N : oTGG (SEQ ID NO: 22),
- T451 en K : oTGH (SEQ ID NO: 23),
- V452 en N : oTGI (SEQ ID NO: 24),
- A 455 en F : oTGJ (SEQ ID NO: 25),
- 5 - L457 en A : oTGK (SEQ ID NO: 26),
- I459 en A : oTG L (SEQ ID NO: 27).

Les oTGE à I introduisent des mutations dans la boucle CD de la fibre adénovirale sur des acides aminés qui sont non conservatifs entre l'Ad5 et l'Ad3
10 alors que les oTGJ à K concernent des acides aminés du feuillet D non engagés dans une liaison hydrogène stabilisant la structure.

Les mutagénèses peuvent être réalisées sur le vecteur M13TG6526 ou M13TG6528. Le premier porte le fragment *HindIII-SmaI* sauvage et le second ce même fragment modifié par l'insertion des séquences GRP. Les plasmides portant le
15 génome adénoviral peuvent être reconstitués comme décrit auparavant pour les plasmides pTG4225 (E1 sauvage) et pTG4226 (LacZ à la place de la région E1). Les virus sont générés par transfection des cellules 293 ou bien de cellules surexprimant le récepteur liant le ligand concerné. De telles cellules peuvent être générées par transfection de l'ADN complémentaire correspondant. On utilise de
20 préférence des cellules qui n'expriment pas naturellement le récepteur cellulaire naturel des adénovirus, par exemple la lignée Daudi (ATCC CCL213).

EXEMPLE 4 : Insertion du ligand dans une protéine de capsid
autre que la
fibre en association avec une des modifications de la fibre
25 précitées.

Cet exemple décrit l'insertion du ligand EGF dans la protéine de capsid hexon. Bien entendu, il est préférable que l'adénovirus correspondant ait perdu sa capacité d'attachement au récepteur cellulaire naturel. Son génome peut par exemple
30 inclure un gène de la fibre modifié (voir exemple 3) ou être dépourvu d'une partie au moins des séquences de la fibre.

On construit un plasmide de transfert pour la recombinaison homologue couvrant la région du génome d'Ad5 codant pour l'hexon (nt 18842-21700). Le fragment d'Ad5 *HindIII-XhoI* (nt 18836-24816) est cloné dans pBSK+ (Stratagène) digéré par ces mêmes enzymes pour donner le plasmide pTG4224. Les séquences
5 codant pour le peptide EGF sont introduites dans la boucle hypervariable L1 de l'hexon par création de fragments chimériques par PCR : hexon (nt19043-19647)-*XbaI*-EGF-*BsrGI*-hexon (nt19699-20312). Le fragment nt19043 à 19647 est obtenu par amplification PCR à partir du plasmide pTG3602 avec les oligonucléotides oTG11102 (SEQ ID NO: 28) et oTG11103 (SEQ ID NO: 29). Le fragment nt19699
10 à 20312 est amplifié à partir du même ADN avec les oligonucléotides oTG11104 (SEQ ID NO: 30) et oTG11105 (SEQ ID NO: 31). L'EGF est cloné à partir de l'ADNc à l'aide des oligonucléotides oTG11106 (SEQ ID NO: 32) et oTG11107 (SEQ ID NO: 33) permettant de mettre la séquence codante de l'EGF en phase avec l'hexon. Les produits PCR sont digérés par les enzymes adéquates puis reliqués. Le
15 fragment chimérique peut alors être inséré par recombinaison homologue dans le plasmide pTG4224 linéarisé par *NdeI* (nt 19549), pour donner pTG4229. Les séquences codant pour l'hexon modifié peuvent être obtenues par digestion *HindIII-XhoI* et remplacées dans leur contexte génomique par recombinaison homologue. On peut utiliser le vecteur pTG3602, pTG4607, pTG4629 linéarisé par *SgfI* ou un
20 vecteur portant le génome adénoviral délété des séquences de la fibre (comme pTG4607 décrit ci-dessous) ou exprimant une fibre modifiée conformément à l'exemple 3.

Le génome adénoviral incapable de produire une fibre native fonctionnelle est obtenu par une délétion touchant le codon initiateur mais ne s'étendant pas aux
25 autres ORFs adénoviraux. On procède de la façon suivante: le fragment adénoviral en 5' de la délétion (nt 30564 à 31041) est amplifié par PCR à l'aide des amorces oTG7171 et oTG7275 (SEQ ID NO: 34 et 35). L'amplification du fragment en 3' (nt 31129 à 33099) met en oeuvre les amorces oTG7276 et oTG7049 (SEQ ID NO: 36 et 37). Les fragments PCR sont digérés par *XhoI* et mis en ligation avant d'être
30 introduits par recombinaison homologue dans le vecteur pTG6591 linéarisé par

NdeI, pour donner pTG4602. Puis le fragment *BstEII* isolé de ce dernier est soumis à une recombinaison homologe avec le vecteur pTG3602 digéré par *SpeI*. On obtient pTG4607. Le vecteur pTG4629 est équivalent à pTG4607, mais porte en outre la cassette d'expression *LacZ* à la place de E1.

- 5 Les virus correspondants peuvent être obtenus après transfection de cellules 293 ou de cellules surexprimant le récepteur de l'EGF. L'étude de la spécificité d'infection pourra être réalisée comme décrit auparavant en utilisant l'EGF en tant que compétiteur.

- 26 -

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: Transgene S.A
(B) RUE: 11 rue de Molsheim
(C) VILLE: Strasbourg
(E) PAYS: France
(F) CODE POSTAL: 67000
(G) TELEPHONE: (33) 03 88 27 91 00
(H) TELECOPIE: (33) 03 88 27 91 11

(A) NOM: Centre National de la Recherche Scientifique
(CNRS)
(B) RUE: 3 rue Michael Ange
(C) VILLE: Paris
(E) PAYS: France
(F) CODE POSTAL: 75794 Cedex 16
(G) TELEPHONE: (33) 01 44 96 40 00
(H) TELECOPIE: (33) 01 44 96 50 00

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Fibre adenovirale modifiée et adenovirus cibles

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 37

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 581 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Mastadenovirus
(B) SOUCHE: adenovirus 5
(C) INDIVIDUEL ISOLE: fibre Ad5

- 27 -

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Met	Lys	Arg	Ala	Arg	Pro	Ser	Glu	Asp	Thr	Phe	Asn	Pro	Val	Tyr	Pro	1	5	10	15
Tyr	Asp	Thr	Glu	Thr	Gly	Pro	Pro	Thr	Val	Pro	Phe	Leu	Thr	Pro	Pro	20	25	30	
Phe	Val	Ser	Pro	Asn	Gly	Phe	Gln	Glu	Ser	Pro	Pro	Gly	Val	Leu	Ser	35	40	45	
Leu	Arg	Leu	Ser	Glu	Pro	Leu	Val	Thr	Ser	Asn	Gly	Met	Leu	Ala	Leu	50	55	60	
Lys	Met	Gly	Asn	Gly	Leu	Ser	Leu	Asp	Glu	Ala	Gly	Asn	Leu	Thr	Ser	65	70	75	80
Gln	Asn	Val	Thr	Thr	Val	Ser	Pro	Pro	Leu	Lys	Lys	Thr	Lys	Ser	Asn	85	90	95	
Ile	Asn	Leu	Glu	Ile	Ser	Ala	Pro	Leu	Thr	Val	Thr	Ser	Glu	Ala	Leu	100	105	110	
Thr	Val	Ala	Ala	Ala	Ala	Pro	Leu	Met	Val	Ala	Gly	Asn	Thr	Leu	Thr	115	120	125	
Met	Gln	Ser	Gln	Ala	Pro	Leu	Thr	Val	His	Asp	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	130	135	140	
Ala	Thr	Gln	Gly	Pro	Leu	Thr	Val	Ser	Glu	Gly	Lys	Leu	Ala	Leu	Gln	145	150	155	160
Thr	Ser	Gly	Pro	Leu	Thr	Thr	Thr	Asp	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Thr	165	170	175	
Ala	Ser	Pro	Pro	Leu	Thr	Thr	Ala	Thr	Gly	Ser	Leu	Gly	Ile	Asp	Leu	180	185	190	
Lys	Glu	Pro	Ile	Tyr	Thr	Gln	Asn	Gly	Lys	Leu	Gly	Leu	Lys	Tyr	Gly	195	200	205	
Ala	Pro	Leu	His	Val	Thr	Asp	Asp	Leu	Asn	Thr	Leu	Thr	Val	Ala	Thr	210	215	220	
Gly	Pro	Gly	Val	Thr	Ile	Asn	Asn	Thr	Ser	Leu	Gln	Thr	Lys	Val	Thr	225	230	235	240
Gly	Ala	Leu	Gly	Phe	Asp	Ser	Gln	Gly	Asn	Met	Gln	Leu	Asn	Val	Ala	245	250	255	
Gly	Gly	Leu	Arg	Ile	Asp	Ser	Gln	Asn	Arg	Arg	Leu	Ile	Leu	Asp	Val	260	265	270	

- 28 -

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln
 275 280 285
 Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn
 290 295 300
 Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu
 305 310 315 320
 Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile
 325 330 335
 Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro
 340 345 350
 Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp
 355 360 365
 Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp
 370 375 380
 Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr
 385 390 395 400
 Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu
 405 410 415
 Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile
 420 425 430
 Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile
 435 440 445
 Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn
 450 455 460
 Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe
 465 470 475 480
 Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly
 485 490 495
 Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala
 500 505 510
 Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys
 515 520 525
 Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp
 530 535 540
 Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly
 545 550 555 560

- 29 -

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser
 565 570 575

Tyr Ile Ala Gln Glu
 580

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 60 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7000
 (code pour PSASASASAPGS)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

AACGATTCTT TAGCTGCCGG GAGCAGAGGC GGAGGCGGAG GCGCTGGGTT CTTGGGCAAT 60

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 57 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese otg7001
 (code pour GRP)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

AACGATTCTT TACATCAGGT GGCCACAGC CCAGTGGTTT CCGCTGCCGG GAGCAGA 57

- 30 -

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG10776

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

CCTTCCACGG GAAGATTGTA

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
 - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG10781

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GGGGTGTCTG TCTTCACT

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 26 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- 31 -

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11065

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

GGGAAGCTTG AGGTTAACCT AAGCAC

26

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 28 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11066

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GGGTCTAGAG CTGCCGGGAG CAGAGGCG

28

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 29 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11067

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

- 32 -

GGGCTCGAGT TATGTTTCAA CGTGTTTAT

29

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11068

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

GTGCCCCGGGG AGTTTATTAA TATC

24

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 31 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Homo sapiens

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11069
(clonage EGF)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

CGGTCTAGAA ATAGTGACTC TGAATGTCCC C

31

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 46 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique

- 33 -

(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Homo sapiens

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11070
(clonage EGF)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

GCGCTCGAGC ACAAACGATT CTTTAGCGCA GTTCCACCA CTCAG

46

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 42 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Mastadenovirus

(B) SOUCHE: adenovirus 5

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7414
(deletion du feuillet D)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

TAGCACTCCA TTTTCGTCGG ATCCTTGAAC TGTTCCAGAT AT

42

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 43 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- 34 -

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Mastadenovirus

(B) SOUCHE: adenovirus 5 (Ad5)

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGA
(deletion de la boucle CD)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

CTTATAATAA GATGAGCACT GGATCCAGCC AAAACTGAAA CTG

43

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 45 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Mastadenovirus

(B) SOUCHE: adenovirus 5 (Ad5)

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGB
(deletion boucle CD et f.D)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

GTAGCACTCC ATTTTCGTCG GATCCAACAG CCAAACTGA AACTG

45

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 88 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

- 35 -

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus humain Ad3
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11135
(boucle CD5 en CD3)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

CGTCAAATCT TATAATAAGA TGAGCACTCA CGTTTTTGT TTTAAACAGG GTGTTGTAGT 60
CGCTAACAGC CAAAACGTAA ACTGTAGC 88

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 64 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Adenovirus (Mastadenovirus)
- (B) SOUCHE: Adenovirus 3
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG10350
(feuillet D5 en D3)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

GTAGCACTCC ATTTTCGTCA AAGTAGAGCT CCACGTTGAT ACTTTGAACT GTTCCAGATA 60
TTGG 64

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 88 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

- 36 -

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus Ad3
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11136
(CD+D5 en CD+D3)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

CGTCAAAGTA GAGCTCCACG TTGATACTCA CGTTTTTGTT TTAAACAGG GTGTTGTAGT 60

CGCTAACAGC CAAAACTGAA ACTGTAGC 88

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 56 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGC
(rempl. coude GSLA en DKLT)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

TTGAACTGTT CCAGATATTG GGGTCAGTTT GTCTTTAACA GCCAAACTG AACTG 56

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 48 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

- 37 -

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGD
(rempl. coude SGTV en DKLT)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

AATAAGATGA GCACTTTGGG TCAGTTTGTC TATTGGAGCC AAAC TGCC

48

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 44 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGE
(rempl. G443 en D)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

CCAGATATTG GAGCCAAACT GTCTTTAACA GCCAAACTG AAAC

44

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 42 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGF
(rempl. L445 en F)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

TGTTCCAGAT ATTGGAGCGA AACTGCCTTT AACAGCCAAA AC

42

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 22:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 42 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGG
(rempl. G450 en N)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

ATGAGCACTT TGAAGTGTGT TAGATATTGG AGCCAAACTG CC

42

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 44 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGH
(rempl. T451 en K)

- 39 -

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

TAAGATGAGC ACTTTGAACC TTTCCAGATA TTGGAGCCAA ACTG

44

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 24:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 45 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGI
(rempl. V452 en N)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

CTTATAATAA GATGAGCACT TTGGTTTGTT CCAGATATTG GAGCC

45

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 25:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 48 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGJ
(rempl. A455 en F)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:

GTCAAATCTT ATAATAAGAT GGAACTTTG AACTGTTCCA GATATTGG

48

- 40 -

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 26:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 47 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTgK
(rempl. L457 en A)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26:

CCATTTTCGT CAAATCTTAT AATTTTATGA GCACTTTGAA CTGTTCC

47

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 27:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 46 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTGL
(rempl. I459 en A)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 27:

GCACTCCATT TTCGTCAAAT CTAGCAATAA GATGAGCACT TTGAAC

46

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 28:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 41 -

- (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11102
(clonage hexon)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 28:

CGGTTTCATCC CTGTGGACCG TGA

23

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 29:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 38 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11103
(clonage hexon)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 29:

GGCCTCTAGA GTTGAGAAAA ATTGCATTTC CACTTGAC

38

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 30:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

- 42 -

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Mastadenovirus
 - (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
 - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11104
(clonage hexon)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 30:

GGTATTGTAC AGTGAAGATG TAG

23

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 31:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Mastadenovirus
 - (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
 - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11105

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 31:

CGTTGGAAGG ACTGTACTTT AGC

23

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 32:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 38 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

- 43 -

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Homo sapiens

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11106
(clonage cDNA EGF)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 32:

CGCGTCTAGA GGCGAATAGT GACTCTGAAT GTCCCTG

38

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 33:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 45 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Homo sapiens

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG11107
(clonage cDNA EGF)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 33:

CCACTGTACA ATACCACTTT AGGGCGCAGT TCCCACTT TCAGG

45

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 34:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 21 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Mastadenovirus

(B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7171
(deletion de la fibre)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 34:

ATGGTTAACT TGCACCAAGT C

21

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 35:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7275
(deletion de la fibre)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 35:

GGGCTCGAGC TGCAACAACA TGAAGAT

27

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 36:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7276
(deletion de la fibre)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 36:

CCGCTCGAGA CTCCTCCCTT TGTATCC

27

- 45 -

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 37:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: Adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7049
(deletion de la fibre)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 37:

CTGCCCCGGA GTTTATTAAT

20

Revendications

1. Fibre d'un adénovirus modifiée par mutation d'un ou plusieurs résidus de ladite fibre, caractérisée en ce que lesdits résidus mutés sont dirigées vers le récepteur
5 cellulaire naturel dudit adénovirus.
2. Fibre d'un adénovirus selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par mutation d'un ou plusieurs résidus compris entre la boucle CD et le feuillet β I de ladite fibre et, de préférence entre les boucles CD et DG.
- 10 3. Fibre d'un adénovirus selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle dérive d'une fibre d'un adénovirus de type 5 (Ad5) comprenant tout ou partie de la séquence telle que montrée à l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO: 1) et qu'elle est modifiée par mutation d'un ou plusieurs résidus de la région
15 comprise entre les résidus 441 et 557.
4. Fibre d'un adénovirus Ad5 selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par mutation d'un ou plusieurs résidus de la région comprise entre les résidus 441 à 478 de la SEQ ID NO: 1 et, de préférence, 443 à 462.
- 20 5. Fibre d'un adénovirus Ad5 selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par substitution :
 - du résidu glycine en position 443 par un résidu acide aspartique,
 - du résidu leucine en position 445 par un résidu phénylalanine,
 - 25 - du résidu glycine en position 450 par un résidu asparagine,
 - du résidu thréonine en position 451 par un résidu lysine,
 - du résidu valine en position 452 par un résidu asparagine,
 - du résidu alanine en position 455 par un résidu phénylalanine,
 - du résidu leucine en position 457 par un résidu alanine, et/ou
 - 30 - du résidu isoleucine en position 459 par un résidu alanine.

6. Fibre d'un adénovirus Ad5 selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par substitution :
- du résidu glycine en position 443 par un résidu acide aspartique,
 - du résidu sérine en position 444 par un résidu lysine, et
 - 5 - du résidu alanine en position 446 par un résidu thréonine ;
- ou
- du résidu sérine en position 449 par un résidu acide aspartique,
 - du résidu glycine en position 450 par un résidu lysine,
 - du résidu thréonine en position 451 par un résidu leucine, et
 - 10 - du résidu valine en position 452 par un résidu thréonine.
7. Fibre d'un adénovirus Ad5 selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par délétion
- de la région s'étendant de la sérine en position 454 à la phénylalanine en position 461,
 - 15 - de la région s'étendant de la valine en position 441 à la glutamine en position 453, ou
 - de la région s'étendant de la valine en position 441 à la phénylalanine en position 461.
- 20
8. Fibre d'un adénovirus selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle dérive d'une fibre d'un adénovirus de type 2 (Ad2) et qu'elle est modifiée par mutation d'un ou plusieurs résidus de la région comprise entre les résidus 441 et 558 de ladite fibre.
- 25
9. Fibre d'un adénovirus Ad2 selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par mutation d'un ou plusieurs résidus de la région comprise entre les résidus 441 à 478 et, de préférence, 451 à 466 de ladite fibre.
- 30
10. Fibre d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que l'une au moins des modifications est une délétion d'au moins 3 résidus consécutifs d'une boucle et/ou d'un feuillet de ladite fibre et que lesdits résidus

délétés sont remplacés par des résidus d'une boucle et/ou d'un feuillet équivalent dérivé d'une fibre d'un second adénovirus, notamment de type 3 ou 7, suceptible d'interagir avec un récepteur cellulaire différent dudit premier adénovirus.

5

11. Fibre d'un adénovirus caractérisée en ce qu'elle présente une capacité de liaison au récepteur cellulaire naturel substantiellement réduite et qu'elle est capable de trimériser.

10 12. Fibre d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un ligand capable de reconnaître une molécule de surface cellulaire différente du récepteur cellulaire naturel dudit adénovirus.

13 13. Fibre d'un adénovirus selon la revendication 12, caractérisée en ce que le ligand est sélectionné parmi le groupe constitué par un anticorps, un peptide, une hormone, un polypeptide ou encore un sucre.

14 14. Fibre d'un adénovirus selon la revendication 12 ou 13, caractérisée en ce que le ligand est inséré à l'extrémité C-terminale de la fibre ou, lorsque l'une au moins des modifications est une délétion d'au moins 3 résidus consécutifs, en remplacement des résidus délétés.

15 15. Fragment d'ADN ou vecteur d'expression codant pour une fibre d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 14.

25

16. Lignée cellulaire caractérisée en ce qu'elle comprend soit sous forme intégrée dans le génome ou sous forme d'épisome un fragment d'ADN selon la revendication 15 placé sous le contrôle des éléments permettant son expression dans ladite lignée cellulaire.

17. Lignée cellulaire selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'elle est en outre capable de compléter un adénovirus déficient pour une ou plusieurs fonctions sélectionnées parmi les fonctions codées par les régions E1, E2, E4 et L1-L5.
18. Lignée cellulaire selon la revendication 16 ou 17, caractérisée en ce qu'elle dérive de la lignée 293.
19. Adénovirus caractérisé en ce qu'il est dépourvu d'une fibre native fonctionnelle et qu'il comprend une fibre selon l'une des revendications 1 à 14, ladite fibre selon l'une des revendications 1 à 14 pouvant être codée par le génome dudit adénovirus ou fournie *en trans* par une lignée cellulaire selon l'une des revendications 16 à 18.
20. Adénovirus caractérisé en ce qu'il est dépourvu d'une fibre fonctionnelle et qu'il comprend une fibre selon l'une des revendications 1 à 14 et un ligand capable de reconnaître une molécule de surface cellulaire différente du récepteur cellulaire naturel dudit adénovirus.
21. Adénovirus selon la revendication 20, caractérisé en ce que le ligand est sélectionné parmi le groupe constitué par un anticorps, un peptide, une hormone, un polypeptide ou encore un sucre.
22. Adénovirus selon l'une des revendications 20 et 21, caractérisé en ce que le ligand est inséré à l'extrémité C-terminale de la fibre ou, lorsque l'une au moins des modifications est une délétion d'au moins 3 résidus consécutifs, en remplacement des résidus délétés.

23. Adénovirus selon l'une des revendications 19 à 21, caractérisé en ce que le ligand est inséré dans une protéine de capside autre que la fibre, notamment l'hexon ou le penton.
- 5 24. Adénovirus selon l'une des revendications 19 à 23, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus recombinant défectif pour la réplication.
25. Adénovirus selon la revendication 24, caractérisé en ce qu'il est délété de tout ou partie de la région E1 et, optionnellement, de tout ou partie de la région E3.
- 10 26. Adénovirus selon la revendication 25, caractérisé en ce qu'il est en outre délété de tout ou partie de la région E2, E4 et/ou L1-L5.
27. Adénovirus selon l'une des revendications 24 à 26, caractérisé en ce qu'il
- 15 comprend un gène d'intérêt sélectionné parmi les gènes codant pour une cytokine, un récepteur cellulaire ou nucléaire, un ligand, un facteur de coagulation, la protéine CFTR, l'insuline, la dystrophine, une hormone de croissance, une enzyme, un inhibiteur d'enzyme, un polypeptide à effet anti-tumoral, un polypeptide capable d'inhiber une infection bactérienne, parasitaire
- 20 ou virale et, notamment le VIH, un anticorps, une toxine, une immunotoxine et un marqueur.
28. Procédé pour produire un adénovirus selon l'une des revendications 19 à 27, caractérisé en ce que :
- 25 - on transfecte le génome dudit adénovirus dans une lignée cellulaire appropriée,
- on cultive ladite lignée cellulaire transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production dudit adénovirus, et
- on récupère ledit adénovirus de ladite culture de ladite lignée
- 30 cellulaire transfectée et, éventuellement, on purifie substantiellement ledit adénovirus.

29. Procédé pour produire un adénovirus dont le génome est dépourvu de tout ou partie des séquences codant pour une fibre, caractérisé en ce que :

- 5 - on transfecte le génome dudit adénovirus dans une lignée cellulaire selon l'une des revendications 16 à 18,
- on cultive ladite lignée cellulaire transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production dudit adénovirus, et
- on récupère ledit adénovirus dans la culture de ladite lignée cellulaire transfectée et, éventuellement, on purifie substantiellement ledit
10 adénovirus.

30. Cellule hôte infectable par un adénovirus selon l'une des revendications 19 à 27 ou susceptible d'être obtenu par un procédé selon la revendication 28 ou 29.

15 31. Composition pharmaceutique comprenant un adénovirus selon l'une des revendications 19 à 27 ou susceptible d'être obtenu par un procédé selon la revendication 28 ou 29 ou une cellule hôte selon la revendication 30 en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

20 32. Utilisation thérapeutique ou prophylactique d'un adénovirus selon l'une des revendications 19 à 27 ou susceptible d'être obtenu par un procédé selon la revendication 28 ou 29 ou d'une cellule hôte selon la revendication 30, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par
25 thérapie génique.

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 542575
FR 9703987

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	J. GALL ET AL.: "Adenovirus type 5 and 7 capsid chimaera: Fiber replacement alters receptor tropism without affecting primary immune neutralization epitopes" JOURNAL OF VIROLOGY., vol. 70, no. 4, avril 1996, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US, pages 2116-2123, XP002050655 * figure 1 *	1,10,11, 15-20, 24-26
D,X	WO 96 26281 A (GENVEC, INC.) 29 août 1996 * exemples 2,5,7 *	1,10,11, 15-20, 24-26
X,D	WO 95 26412 A (THE UAB RESEARCH FOUNDATION) 5 octobre 1995 * le document en entier *	12-22, 24-30
X	A. MCCLELLAND ET AL: "Modification of the adenovirus fiber protein for targeted gene delivery" JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY - SUPPLEMENT, 26 mars 1995, page 411 XP000608380 * abrégé *	1,10,11
X,D	WO 95 05201 A (GENETIC THERAPY, INC.) 23 février 1995 * exemples 1-4 *	12-22, 24-30
X	WO 94 17832 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 18 août 1994 * page 3, ligne 12 - page 4, ligne 11 *	12-30
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
19 décembre 1997		Cupido, M
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2

EPO FORM 1503 (03.92) (P04C13)

